Intrazelluläre Ableitungen von Neuronen des Blutegels
F-Praktikum Neurophysiologie
WS 2005/2006

Jutta Kretzberg
email: jutta.kretzberg@uni-oldenburg.de
Tel. 0441 / 798-3314
Büro W4-0-068
Labor W4-0-043

Vorbemerkung

Bitte erschrecken Sie nicht über die Länge dieses Skriptes. Es enthält einiges an Hintergrundinformation und mehrere alternative Projekte für das Praktikum, zwischen denen Sie wählen können. Ich erwarte von Ihnen, dass Sie

- Am ersten Tag das Experiment mit der Modellzelle (Abschitt 4) durchführen und gewisse Vorarbeiten für das weitere Praktikum erledigen.
- Am zweiten Tag das Experiment zur Charakterisierung von Neuronen (Abschnitt 6) beginnen, das sie voraussichtlich an mindestens einem weiteren Tag fortsetzen werden
- Ca. am dritten Tag das Experiment zur Kodierung (Abschnitt 7) durchführen, dieses kann in Kombination mit der Charakterisierung von Neuronen durchgeführt werden.
- Voraussichtlich am vierten oder fünften Tag sollten Sie - zumindest wenn es keine schwerwiegenden technischen Probleme gibt, entweder das Experiment zur genaueren Charakterisierung (Abschnitten 8) oder das zur synaptischen Übertragung 9 durchführen.
- Reservieren Sie bitte mindestens einen ganzen Tag (der aber z.B. auch durchaus auf mehrere Nachmittage verteilt sein kann) für die Auswertung.
- Ich möchte Ihnen dringend raten, dass jedeR TeilnehmerIn des Praktikums sowohl die Präparation als auch das Ableiten einmal ausprobiert.
- Bitte verstehen Sie dieses Script nicht als Kochrezept, an dass Sie sich sklavisch halten müssen. – Wenn Sie eine Idee haben, was sie lieber ausprobieren wollen als die von mir vorgeschlagenen Experimente: Nur zu! Eigene Ideen sind mir lieber als ein perfekt abgearbeiteter Fragenkatalog.

Dieses Praktikum findet in meinem Labor erst zum zweiten mal statt. Vieles ist noch etwas unfertig und verbesserungsbedürftig - Ich muss Sie deshalb um Verständnis und Geduld bitten und bin für jeden Änderungsvorschlag dankbar!

1 Einleitung: Intrazelluläre Ableitungen

Neben extrazellulären Ableitungen sind Intrazellulärableitungen die klassische Form der Elektrophysiologie. Bei dieser Technik nimmt man das Membranpotential einer Zelle relativ zum

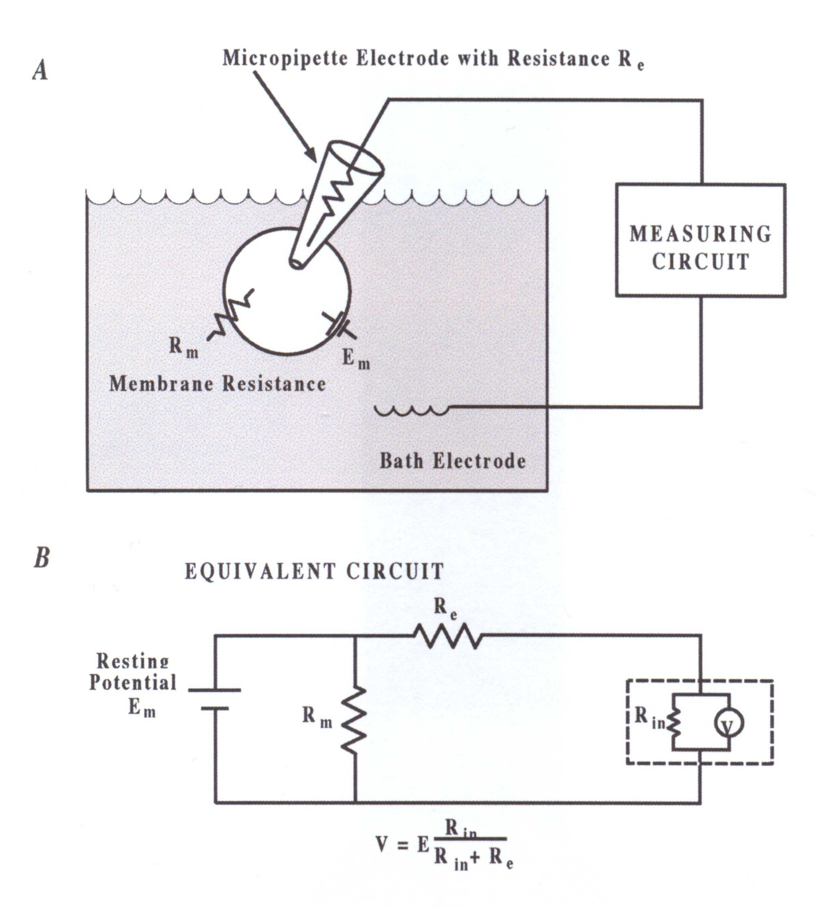
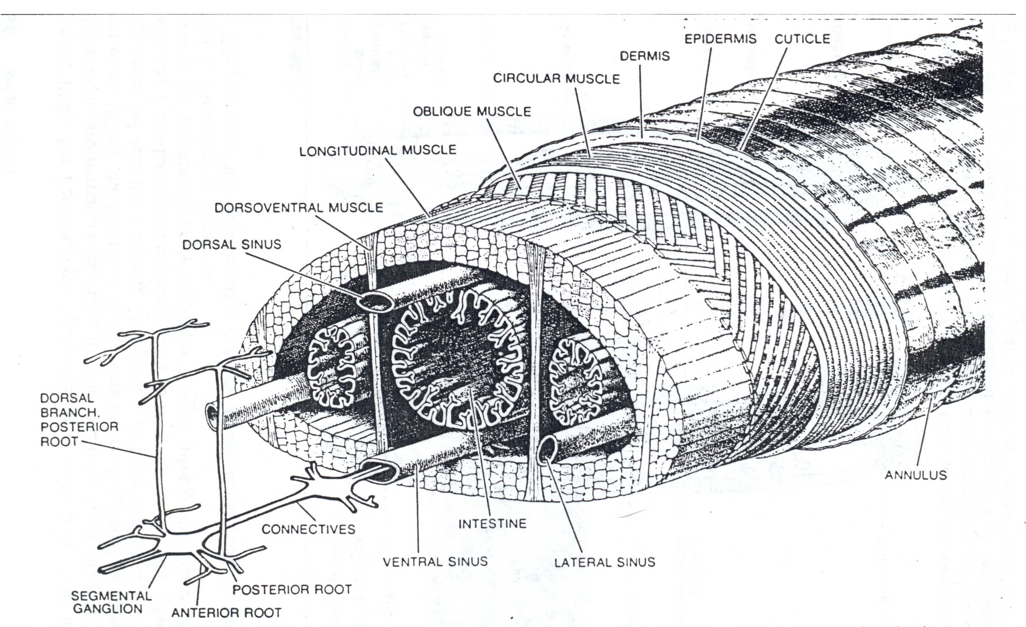


Figure 1-8. Representative Voltmeter with Infinite Resistance
Instruments used to measure potentials must have a very high input resistance R_{in}.

Abbildung 1: Aufbau einer Intrazellulärableitung und entsprechendes Erstatzschaltbild. (Aus "Axon-Guide")

Aussenmedium auf, indem man eine feine Glaskapillare mit einem Elektrolyt durch die Membran in die Zelle einführt. In gewisser Weise nehmen Intrazellulärableitungen eine Zwischenstellung zwischen Extrazellulärableigungen und Patch Clamp ein: Im Gegensatz zum extrazellulären Ableiten können auch Änderungen des Membranpotentials unterhalb der Spikeschwelle detektiert werden. Im Gegensatz zu Patch Clamp ist die räumliche Auflösung aber nicht so fein, dass man Effekte einzelner Kanäle intrazellulär messen könnte.

Um eine Zelle intrazellulär abzuleiten, muss man eine sehr feine Glaskapillare (Spitze $<$ 1 μm) durch die Zellmembran in die Zelle einführen. Das Glasröhrchen ist mit einem Elektrolyt gefüllt und verbindet so das Zellplasma mit dem normalerweise aus Ag/AgCl bestehendem Elektrodendraht. Als Referenzpunkt für die Messung dient eine ebenfalls aus Ag/AgCl bestehende indifferente Elektrode im Aussenmedium. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die Zelle durch das Einführen der Nadel verletzt wird. Mit etwas Übung und Glück schließt sich das Loch in der Membran wieder rund um die Pipettenspitze. Wenn es aber zu groß ist, so dass das Zytoplasma aus der Zelle austritt, stirbt die Zelle. Der Vorteil von Intrazellulärableitungen ist, dass sie die Möglichkeit bieten, Strom in die Zelle zu injezieren und so das elektrische Verhalten der Zelle zu beeinflussen.



▲ Diagram to show the position of the nerve cord within the ventral blood sinus and its relation to other body structures and the musculature. (Reprinted, with permission, from Nicholls and Van Essen 1974.)

Abbildung 2: Querschnitt durch einen Blutegel. (Aus “Neurobiology of the leech”)

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten für intrazelluläre Ableitungen:

Stromklemme (Current Clamp): Die Stromklemme dient der Messung der als *Membranpotential* bezeichneten Spannung zwischen der intrazellulären und der indifferenten Elektrode, wobei der Strom kontroliert wird. Da der Membranwiderstand der Zelle und der Widerständ der Elektrode in Reihe liegen, ist es sehr schwierig, bei variabler Strominjektion den Effekt der Elektrode auf die gemessene Spannung von der Zellantwort zu trennen. Dies wird in modernen Intrazellulärverstärkern ermöglicht durch eine als *“Brückenmessung” (Bridge Balance)* bezeichnete Technik. Diese gleicht die von der Elektrode herrührende rapide Spannungsänderung bei Änderung des injezierten Stroms aus, so dass nur der langsamere Effekt der Zellmembran übrig bleibt. (Alle Intrazellulärableitungen dieses Praktikums werden als Brückenmessungen durchgeführt.)

Spannungsklemme (Voltage Clamp): Umgekehrt wird bei der Spannungsklemme das Potential zwischen den beiden Elektroden kontrolliert und der durch die Membran fließende Strom gemessen. Aus diesem lässt sich dann auf die Membranleitfähigkeit und somit auf die Aktivität von Ionenkanälen zurückschließen. Da die Kontrolle des Membranpotentials über Strominjektion erfolgt, wird die Spannungsklemme traditionell mit zwei Elektroden in der selben Zelle ausgeführt, eine zur Messung und eine um Strom zu injezieren. Wenn nur eine Elektrode verwendet wird, kann diese abwechselnd zur Strominjektion und zur Messung verwendet werden. Eine Weiterentwicklung der Spannungsklemme ist die “Patch Clamp” Technik, die Sie im Praktikumsteil von Andreas Feigenspan kennenlernen.

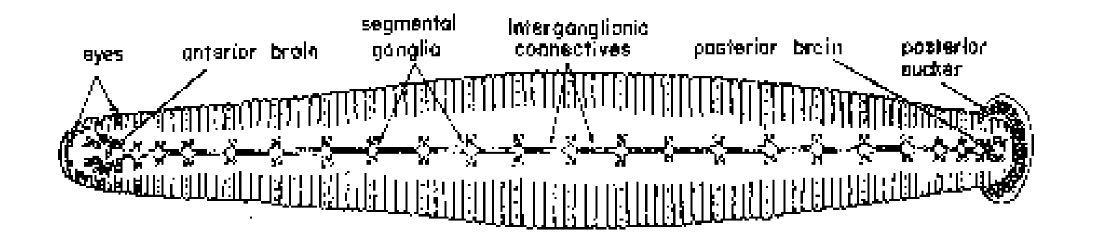


Abbildung 3: Das zentrale Nervensystem des Blutegels. (Aus dem englischen Praktikumsskript)

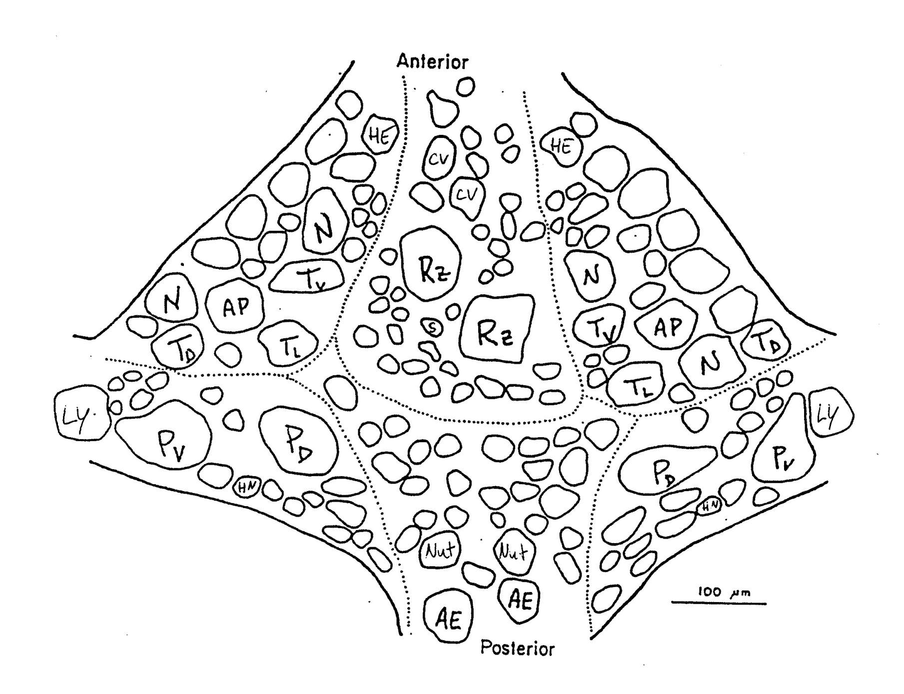


Abbildung 4: Ganglion des Blutegels mit für das Praktikum besonders geeingeten Zellen. Modifiziert aus dem englischen Praktikumsskript.

2 Das Nervensystem des Blutegels

Der medizinische Blutegel *Hirudo medicinalis* gehört zu den Anneliden. Im Gegensatz zum nahe verwandten Regenwurm haben Blutegel immer 32 Segmente, von denen die ersten vier zum “Kopf” und die letzten sieben zum “Schwanz” verschmolzen sind, wo sie unter anderem jeweils einen Saugnapf bilden. Sein Nervensystem besteht entsprechend aus 21 Körper-Ganglien, und verschmolzenen Ganglien am Vorder- und Hinterende des Tieres, die durch einen “Konnektiv” genannten doppelten Nervenstrang miteinander verbunden sind. Seitlich ziehen von jedem Körper-Ganglion Nervenstränge zum Muskelschlauch bzw der Haut des Blutegels. Die Körper-Ganglien sind alle sehr ähnlich zueinander aufgebaut, sie beinhalten (zumindest in erster Näherung) die jeweils die gleichen Neurone, die an der gleichen Stelle im Ganglion (Abb. 4) liegen. Eine Ausnahme bilden die Körpersegmente 5 und 6, die speziell der Reproduktion dienen. Die Zellkörper der insgesamt etwa 400 Neurone eines Ganglions liegen jeweils an der Oberfläche der ventralen und der dorsalen Seite des Ganglions. Das Ganglion ist nahezu spiegelsymmetrisch aufgebaut, fast alle Zellen kommen genau zweimal in jedem Ganglion vor. Eine Schicht aus Gliazellen umschließt das Ganglion. Diese muss bei Intrazellulärableitungen von der Mikropipette durchbrochen werden.

Da das Nervensystem des Blutegels so einfach und stereotyp ist, sind viele Neurone gut charakterisiert und in ihrer Funktion bekannt. Im Rahmen des Praktikums werden Ihnen einige der folgende Zelltypen begegnen:

Retzius-Zellen (RZ) und Leydig-Zellen (Ly): Die beiden Retzius-Zellen als größten Neurone im Blutegelganglion sind durch Ausschüttung von Neuromodulatoren an verschiedenen Verhaltensweisen beteiligt, unter anderem der Steuerung des Schwimmens und der Absonderung von Schleim. Die Leydig-Zellen sind ihnen insofern ähnlich als auch sie durch Neurosekretion potentiell auf viele andere Neurone wirken können.

T-, P- und N-Zellen Diese Zellen sind Sensoren, die auf mechanische Stimulation der Haut reagieren. T-Zellen (touch) reagieren auf leichte Berührung (z.B. Luftblasen im Wasser), P-Zellen (pressure) auf festere (z.B. Antippen mit einem Finger), N-Zellen (noxious) auf sehr starke (z.B. Nadelstich). Taktile Information ist für das Verhalten des Blutegels von entscheidender Bedeutung. Die Sensorzellen haben ihre Zellkörper in den Körper-Ganglien und senden Dendriten in die Haut, wo diese sich fein verzweigen und so Information über Stimulation der gesamten Haut an das zentrale Nervensystem leiten.

CV, AE, AP, HE Diese Zellen sind Motorneurone. Die Axone von CV, AE und AP ziehen zum Muskelschlauch, um dort die Muskelspannung zu kontrollieren. CV ist die Abkürzung für “Ventrolateral Circular excitor”, denn Aktionspotentiale dieses Neurons bewirken, dass die zirkulären Muskeln sich zusammenziehen. AE steht für “Annulus Erector”, Aktivierung dieses Neurons führt dazu, dass die Haut des Segments sich in kleinen Wellen aufstellt. AP heißt “Anterior Pagoda”, benannt nach der regelmäßigen Form der spontan auftretenden Aktionspotentiale. Obwohl dieses Neuron einfach abzuleiten ist, ist seine Funktion unbekannt bis auf die Tatsache, dass es sich um ein Motorneuron handelt. “HE” bedeutet “Heart Excitor” und bewirkt das zusammenziehen des Herzmuskels.

HN Ist ein inhibitorisches Interneuron, das an der Mustergeneration des Herzschlags beteiligt ist. item**S** Ist ebenfalls ein Interneuron. Es ist an vielen Verhaltensweisen wie z.B. Schwimmen und Shortening beteiligt, wobei es unter anderem zur Koordination der Körpersegmente dient, da die S-Zellen aller Segmente miteinander gekoppelt sind. In jedem Ganglion kommt nur eine S-Zelle vor. Sie ist sehr klein und schwierig abzuleiten.

Nut Die Funktion dieser Zelle ist nicht bekannt, sie ist aufgrund ihrer Form "Nut" getauft worden. Im Praktikum könnte Ihnen diese Zelle begegnen, einerseits weil sie aufgrund von Position und Größ mit AE verwechselt werden kann, andererseits weil sie synaptisch mit P gekoppelt ist.

Bitte schauen Sie sich auch das kopierte entsprechende Kapitel aus dem englischen Praktikumsskript an.

3 Im Praktikum verwendete Instrumente

Intrazellulärverstärker: Der in Abbildung 5 gezeigte Intrazellulärverstärker BA1-S ist ein Brückenverstärker, der während Strominjektion in eine Zelle das durch den Widerstand der Elektrode herrührende Spannungsartefakt ausgleichen kann. Da es sich um ein vielseitiges Messgerät für elektrophysiologische Forschung handelt, können die vielen Knöpfe durchaus verwirrend sein. Die Einstellung der einzelnen Regler werden Sie am ersten Praktikumstag mit einer Modellzelle erlernen. Zum Verstärker gehört ein *Messkopf*, an den die Elektrode mit einem Elektrodenhalter angesteckt wird. Dieser Messkopf ist sehr empfindlich, sowohl gegen Erschütterung als auch gegen elektromagnetische Felder. Wichtig zu wissen ist, dass der Verstärker das gemessene Signal um den Faktor 10, 20 oder 50 verstärkt (Schalter 11). Das Messprogramm des Computers ist darauf ausgelegt, dass Sie Verstärkungsfaktor 20 verwenden. Dann entspricht 1 mV auf dem Bildschirm tatsächlich 1 mV in der Zelle.

Oszilloskop: Auch das Oszilloskop (Abb. 6) kann prinzipiell mehr leisten als im Rahmen des Praktikums erforderlich ist. Es kann die Signale von zwei Eingängen gleichzeitig darstellen. Wir benutzen es nur zur schnellen Kontrolle der aktuellen Messwerte, die eigentlichen Messdaten werden von dem Computer aufgezeichnet. Die drei interessantesten Knöpfe sind beim ersten Eingangskanal (CH1) "Volts/DiV" (Skala der Y-Achse) und "Position" (Position der Darstellung auf dem Display) und "SEC/DIV" (Skala der X-Achse) in den "Horizontal"-Einstellungen. Diese müssen jeweils den aktuellen Erfordernissen der Experimente angepasst werden, die eingestellten Werte sind jeweils unten auf dem Display dargestellt. Bitte beachten Sie, dass das Messsignal den Verstärker 20x vergrößert verlässt. Entsprechend müssen Sie die Angaben auf dem Bildschirm des Oszilloskops durch 20 teilen, um den tatsächlichen Spannungswert zu ermitteln.

A/D Wandler: Damit die Messwerte von einem Computer verarbeitet werden können, müssen sie zunächst von Analogsignalen in Digitalsignale übersetzt werden. Das wird von einem A/D Wandler geleistet, der als Steckkarte im Computer eingebaut ist. Die Übermittlung der Signale vom Verstärker zum Computer (Messwerte) und umgekehrt (elektrische Reizung) erfolgt über eine spezielle in die Aparatur eingebaute Anschlussbox für BNC-Kabel, die mit dem Verstärker verbunden wird.

Software: Die zur Datenaufnahme und Stimulation verwendete Software wurde in meinem Labor von drei studentischen Hilfskräften entwickelt. Sie ist brandneu, an manchen Stellen noch etwas unfertig und hat sicher noch den einen oder anderen "bug". Bitte zögern Sie deshalb nicht, mir bescheidzusagen, wenn die Software etwas anderes tut als Sie erwarten. Wir werden die Software am Computer besprechen, deshalb hier nur ein paar Stichworte:

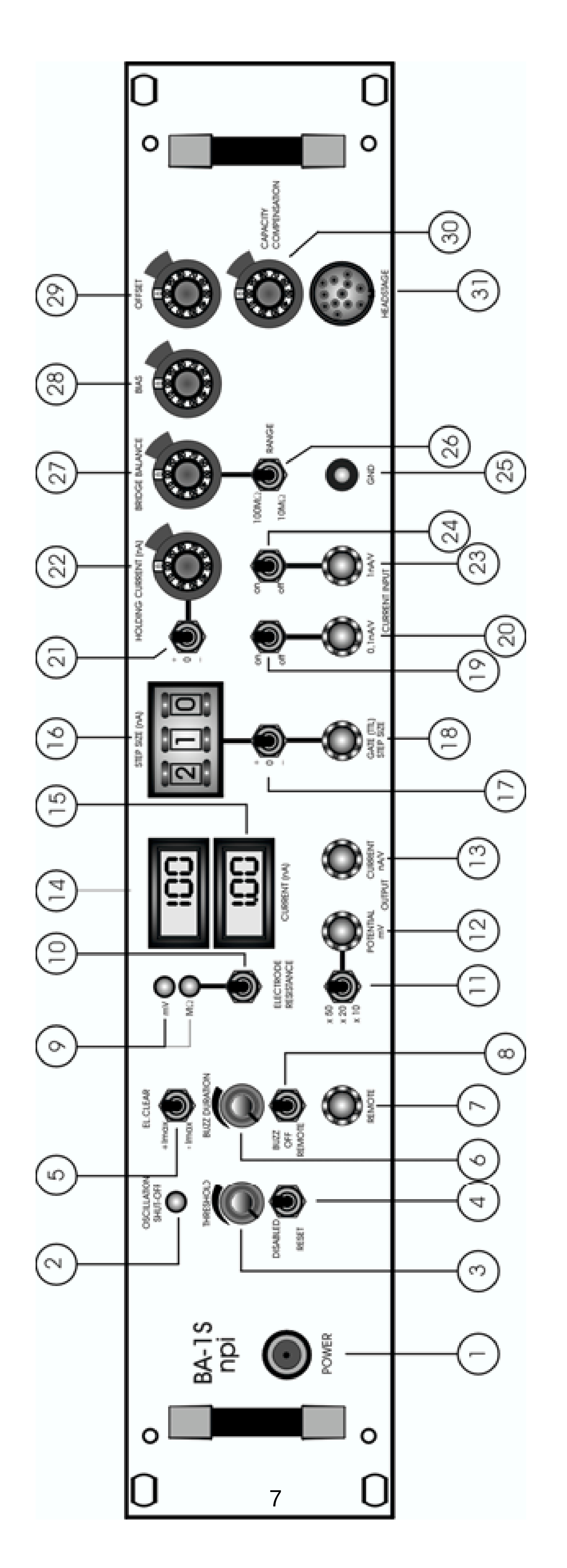


Abbildung 5: Im Praktikum benutzter Intrazellulärverstärker. (Aus dem Verstärker-Handbuch)

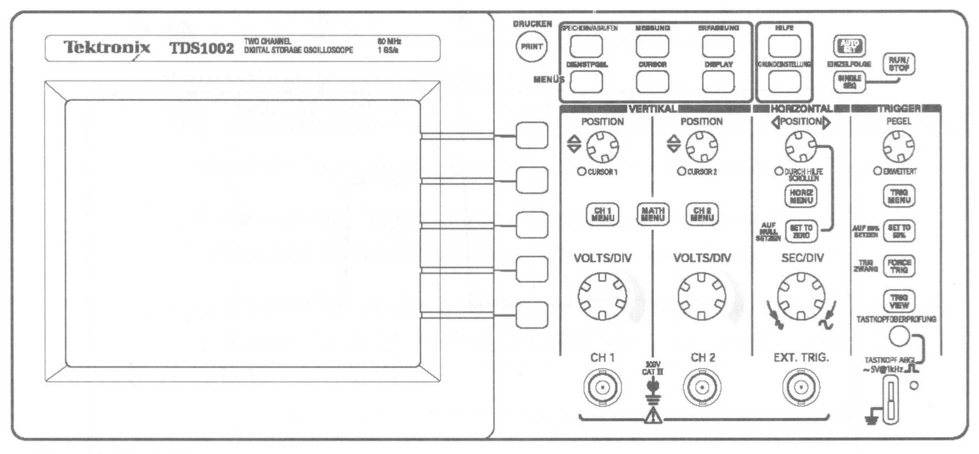


Abbildung 6: Im Praktikum benutztes Oszilloskop, das zur schnellen Orientierung dient. Die eigentlichen Messungen werden per Computer aufgezeichnet.(Aus dem Oszilloskop-Handbuch)

- Die komplette Software ist in der Programmiersprache *Matlab* geschrieben. Deshalb müssen Sie zunächst Matlab starten, wenn Sie den Computer benutzen wollen.
- Um das Programm zur Datenaufnähme und Stimulation zu starten, tippen Sie *ephys* in Matlab ein. Es öffnet sich eine graphische Benutzeroberfläche zur Messung und Stimulation.
- Das Programm spiegelt den üblichen Ablauf eines elektrophysiologischen Experiments wieder: Mit einem der Fragestellung des Experiments entsprechenden Reizprotokoll werden normalerweise mehrere Messungen (“trials”) durchgeführt, zwischen denen der Zelle etwas Erholungszeit gegeben wird (die intern auch zur Darstellung der Daten und zur Datenspeicherung benutzt wird).
- Normalerweise ist der erste Schritt, dass Sie ein sogenanntes *protocol* erstellen, in dem z.B. festgelegt wird, wie lange Daten aufgenommen werden sollen und wie die elektrische Stimulation aussehen soll. Sie erreichen eine weitere graphische Benutzeroberfläche, den sogenannten *protocol creator* indem Sie hinter “protocol” auf “change” klicken.
- Zur Benutzung des Protocol Creators werden wir Ihnen mündlich noch einiges sagen, sehr wichtig zu behalten ist, dass man sich die generierten Reize immer zunächst mit “display” anschauen muss (sie werden sonst nicht in das Programm übernommen!), bevor man das Protokoll abspeichern und den Creator verlassen kann.
- Zur Messung und Stimulation klicken Sie auf “Start”. Wenn die Messung abgeschlossen ist, werden Stimulus und Messdaten auf dem Bildschirm dargestellt.

- Die *Datenauswertung* werden Sie ebenfalls in Matlab vornehmen. Da dies nun zu weit führen würde, bekommen Sie dazu später im Praktikum eine gesonderte Beschreibung.
- Vergessen Sie nicht, Ihre Daten und interessante Abbildungen abzuspeichern!

4 Übung zur Benutzung der Instrumente: Ableitung von einer Modellzelle

Am ersten Praktikumstag wird es vorwiegend darum gehen, den Umgang mit den Messinstrumenten einzuüben. Bitte schauen Sie sich zunächst die Benutzungshinweise für den *Intrazellulärverstärker*, das *Oszilloskop*, den *A/D Wandler* und die *Software* an. Die Handbücher für die einzelnen Komponenten liegen im Labor für Sie bereit, im Zweifelsfall lohnt es sich, dort hineinzugucken.

4.1 Einmalige Vorbereitung

Die einzelnen Komponenten sind noch nicht miteinander verbunden, damit Sie beim Aufbauen ein Gefühl dafür bekommen, wie sie zusammenspielen. Bitte lassen Sie zunächst alle Geräte (auch den Computer) ausgeschaltet. So wird aus der Sammlung von Einzelteilen ein Elektrophysiologie-Messplatz:

1. Verbinden Sie den Messkopf mit dem Intrazellulärverstärker, indem Sie das Kabel in die Buchse "Headstage" (31 in Abb. 5) stecken.

2. Jetzt verbinden Sie die Buchse "Potential mV Output" (12) des Intrazellulärverstärkers mit Hilfe eines BNC-Kabels mit "Channel 0" des A/D Wandlers. (Der A/D Wandler ist bereits mit dem Computer verbunden.) Der Verstärkungsfaktor des Verstärkerausgangs sollte auf x20 eingestellt sein. Jetzt ist die Apparatur prinzipiell schon einsatzfähig, um Signale mit dem Messkopf aufzuzeichnen, mit dem Verstärker 20 fach zu verstärken und mit dem A/D Wandler an den Computer zu übertragen.

3. Da wir nicht nur die spontane Aktivität von Nervenzellen messen wollen, sondern diese auch elektrisch stimulieren, brauchen wir auch eine umgekehrte Übertragung vom Computer über A/D Wandler und Verstärker zum Messkopf. Da Computer und A/D Wandler, sowie Verstärker und Messkopf schon verbunden sind (diese Leitungen funktionieren in beide Richtungen), brauchen wir nur noch eine Verbindung vom A/D Wandler zum Verstärker (diese Leitung überträgt nur in eine Richtung Signale.) Dazu wird die Buchse "Output 0" am A/D Wandler per BNC-Kabel mit "CURRENT INPUT 1 nA/V" (23) am Verstärker verbunden und der dazugehörige Schalter (24) am Verstärker auf ON gestellt.

4. Um den Einfluss von elektrischem Rauschen zu minimieren, lassen Sie bitte den Stecker auf den Eingang 8 des A/D Wandlers stecken. Dadurch wird ein Referenzsignal erzeugt, auf das sich die Messung an Eingang 0 bezieht, und dadurch eine gute differenzielle Messung ermöglicht.

5. Ausserdem muss zur Minimierung des Rauschens der gesamte Messplatz an einem Punkt geerdet sein. Bitte lassen Sie das in "GND" (25) am Verstärker steckende Kabel und alle damit verbundenen Kabel zunächst an ihrem Platz. (Es kann aber sein, dass das Finden und Eliminieren des Rauschens im Praktikum eine große Rolle spielen wird.)

6. Damit man während der Messung oder auch zwischen den Messungen einen guten Überblick über die von der Messelektrode aufgezeichnete Spannung behält, bietet es sich an, ausser dem Computer auch das Oszilloskop zu verwenden. Benutzen Sie dafür ein T-Stück, so dass zwei BNC-Kabel an den Ausgang "Potential mV Output" (12) des

Verstärkers angeschlossen werden können. Eins der Kabel führt weiterhin zum A/D Wandler, das andere zum Eingang “CH1” des Oszilloskops.

4.2 Vorbereitung eines Experiments

Die “Verkabelung” ist jetzt fertig. Um sicherzustellen, dass die Apparatur betriebsbereit ist und keinen Schaden nimmt, müssen aber noch folgende Einstellungen vorgenommen werden. Diese sollten auch später vor jedem Experiment kontrolliert bzw neu eingestellt werden:

1. Stellen Sie den Schalter der Modellzelle auf “100 M, 100 p”. Jetzt modelliert die Modellzelle eine “kleine” Nervenzelle mit einem Membranwiderstand von 100 MΩ und einer Kapazität von 100 pF.

2. Der Messkopf steht auf 1x (und sollte bitte von Ihnen auch nie auf 10x umgestellt werden!).

3. Stellen Sie am Intrazellulärverstärker den “Offset” (29) und “BIAS” (28) auf 5 (also jeweils in die Mitte des möglichen Bereichs).

4. Alle anderen Drehknöpfe des Verstärkers (Holding Current (22), Bridge Ballance (27) und Capacity Compensation (30)) sollten auf 0 gedreht werden (und auch bei späteren Experimenten immer wieder zumindest auf Werte ≤ 1 zurückgesetzt werden.)

5. Die Kippschalter am Intrazellulärverstärker sind folgendermassen eingestellt:
   - “OSCILLATION SHUT-OFF” (4) steht auf “disabled”.
   - “EL CLEAR” (5) steht in der Mitte
   - “BUZZ” (8) steht auf “OFF”
   - “ELECTRODE RESISTANCE” (10) ist nicht gedrückt
   - “Potential mV” (11) steht auf 20 (damit Computerprogramm und Verstärker optimal aufeinander eingestellt sind. Allerdings muss dieser Verstärkungsfaktor beim Ablesen auf dem Oszilloskop bedacht werden.)
   - “STEP SIZE” (17) steht auf 0
   - “CURRENT INPUT 0.1 NA/V” (19) steht auf OFF
   - “CURRENT INPUT 1 NA/V” (24) steht auf ON
   - “BRIDGE BALANCE RANGE” (26) steht auf 100 MΩ

6. Am Oszilloskop stellen Sie zunächst die X-Achse “SEC/DIV” auf 50 ms und die Y-Achse “VOLTS/DIF” auf 5 V. (Diese Einstellungen werden Sie häufig Ihren Erfordernissen anpassen müssen. Beachten Sie dabei die 20x Verstärkung durch den Verstärker.)

Jetzt können Sie den Verstärker, das Oszilloskop und den Computer anschalten. Während der Verstärker sich auf seine Betriebstemperatur aufwärmt, bereiten Sie bitte Ihr Experiment am Computer vor. Auch diese Prozedur werden Sie nicht nur für die Messung mit der Modellzelle, sondern vor jedem Experiment durchführen müssen.

1. Starten Sie Matlab 7.0

2. Tippen Sie “ephys” in das Matlabfenster ein und drücken Return. Es öffnet sich eine graphische Benutzeroberfläche zur Steuerung eines Elektrophysiologie-Experiments.

3. Geben Sie dem geplanten Experiment einen aussagekräftigen Namen, z.B. Modellzelle.

4. Generieren Sie das für den ersten Schritt des Experiments nötige Protokoll, indem Sie bei “protocol” auf “change” klicken.

5. Es öffnet sich ein Dialogfenster. Ändern Sie zunächst den Namen des Protokolls, so dass Sie sich später wieder daran erinnern, zu welchem Zweck Sie dieses Protokoll erstellt haben, z.B. modellzelle-aufg1.

6. Überlegen Sie, ob die Standardeinstellungen “Anzahl Zellen”, “Samplerate”, “Dauer” den Anforderungen für das Experiment genügen. Für diesen ersten Versuch nutzen Sie eine Zelle und einen Stimulus, eine Dauer von 10 s und Samplerates von 1.000 Hz für die Stimulation und 10.000 Hz für die Datenaufnahme.

7. Generieren Sie nun den eigentlichen Reiz. Für dieses erste Experiment verwenden Sie bitte einen 10 s langen Stimulus, der 5 s lang bei 0 nA gehalten wird, dann für 2.5 s auf 1 nA springt und zum Schluss wieder auf 0 nA abfällt. Denken Sie daran auf “preview” zu klicken, damit der Reiz übernommen wird.

8. Kommentieren Sie das gerade erstellt Protokoll, damit Sie später noch wissen, wofür es gut war.

9. Um das Dialogfenster schließen zu können, müssen Sie es zuerst speichern. Es ist darauf zu achten, dass Sie einen neuen Name fr das Protokoll gewählt haben, da es sonst nicht in das Experiment bernommen wird. Klicken Sie also auf “save”, um das Protokoll zu speichern und kehren danach zur Software zur Experimentsteuerung zurück, indem Sie das Fenster des Protocol Creators schließen.

10. Für Fragen bezüglich der verschiedenen Knpfe ist auf den Oberflchen jeweils eine Hilfe vorhanden.

Speziell für diese Experiment ist es nötig, die Modellzelle mit der Ableitaparatur zu verbinden: Bitte verbinden Sie vorsichtig (!) die den Ausgang $R_{EL} = 100M\Omega$ der Modellzelle mit dem BNC-Eingang des Messkopfes und stecken das Kabel “GND” (Ground = Messerde) in die Buchse auf der Rückseite des Messkopfes. *Achtung! Der Messkopf ist extrem empfindlich! Er darf weder stark erschüttert werden, noch starken elektromagnetischen Feldern ausgesetzt werden. Deshalb empfiehlt es sich, ein Stück geerdetes Metall (z.B. den Farradayschen Käfig) anzufassen, wenn man den Messkopf berührt.*

Bevor Sie die eigentlichen Messungen beginnen, sollten Sie jetzt mit Hilfe des Oszilloskops einige Einstellungen am Verstärker vornehmen, die ebenfalls vor jedem Experiment nötig sind:

1. Stellen Sie den vom Verstärker angezeigten Stromwert (15) auf 000, indem Sie den Drehknopf “BIAS” verwenden, und schreiben sich den Wert des Reglers auf. Dieser Wert kann für alle weiteren Messungen so bleiben, Sie können deshalb den Regler feststellen.

2. Stellen Sie den OFFSET am Drehregler so ein, dass der am Verstärker angezeigte Spannungswert (14) genau 000 ist. Notieren Sie den eingestellten Wert des Drehknopfes. (Der Offset wird später auch bei jeder Verwendung einer neuen Elektrode jedesmal neu eingestellt.)

3. Falls die Anzeige der Stroms (15) jetzt nicht mehr 000 ist, notieren Sie bitte den entsprechenden Wert. Falls er grösser als 002 oder kleiner als -002 sein sollte, sagen Sie mir bitte Bescheid.

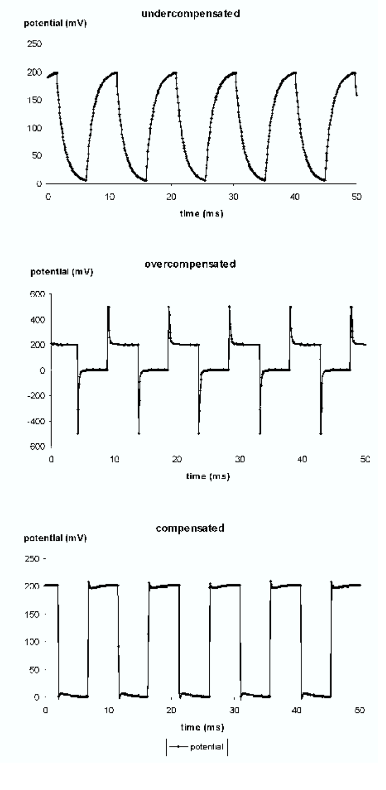


Figure 8: Tuning of the capacitance compensation using a 100 MΩ resistor

Abbildung 7: Einstellung der Kapazitätskompensation. (Aus dem Verstärker-Handbuch)

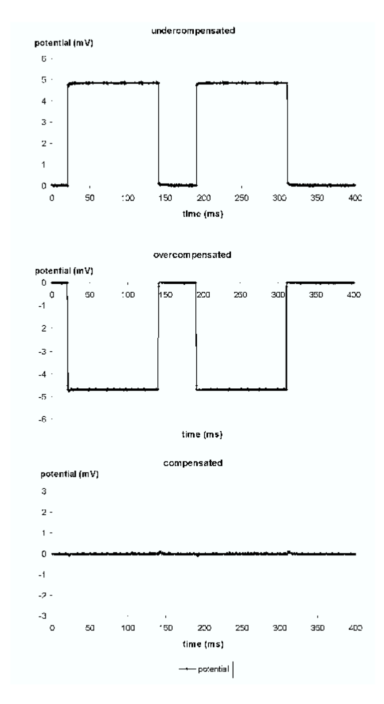


Figure 9: Tuning of the BRIDGE BALANCE using 100 MΩ resistor

Abbildung 8: Einstellung der Brücke bei Verwendung der Modellzelle.(Aus dem Verstärker-Handbuch)

4. Drücken Sie den Schalter “ELECTRODE RESISTANCE” (10). Damit aplizieren Sie rechteckige Strompulse in die Modellzelle. Sie sollten jetzt auf dem Oszilloskop die gemessenen Antworten der Modellzelle sehen. Notieren Sie bitte den vom Verstärker bei 14 angezeigten Widerstand. Überprüfen Sie, ob Sie am Osziloskop den gleichen Wert ablesen. Wie lang sind die einzelnen Pulse?

5. Unter anderem durch die Kapazität des Pipettenglases kommt es zu ungewollten Effekten im Messsignal bei schnellen Änderungen des injezierten Stroms. Kompensieren Sie mit dem Drehrad “CAPACITY COMPENSATION” (30) die Eingangskapazität, bis die gemessenen Pulse möglichst ähnlich wie Rechteckpulse aussehen. Abbildung 7 hilft Ihnen dabei. Notieren Sie den Wert des Drehrads.

6. Wenn mittels einer Elektrode Strom in eine Zelle injeziert wird, führt der Elektrodenwiderstand zu einem Abfall der gemessenen Spannung. Da man in einem elektrophysiologischen Experiment ausschließlich die Spannung der Zellmembran messen will, ist in Intrazellulärverstärker eine sogenannte “BRIDGE BALLANCE”-Funktion eingebaut, um das Artefakt durch die Elektrode zu kompensieren. Abbildung 8 hilft Ihnen, die richtige Einstellung für den “BRIDGE BALLANCE”-Regler (27) zu finden. Notieren Sie den Wert. Drehen Sie anschliessend den Regler für die Experimente mit der Modellzelle wieder auf 0 (aber nicht, wenn Sie von echten Zellen ableiten!).

4.3 Modellzellen-Experiment 1

Diese Übung ist Pflicht, muss aber nicht ins Protokoll.
Endlich fertig, jetzt geht es los: “Start” startet das Experiment. Während des Experiments sollten Sie auf dem Oszilloskop sehen, was der Messkopf aufzeichnet. Wenn die Datenaufnahme abgeschlossen ist, erscheinen die Messdaten auf dem Computerbildschirm. Sie können das Experiment so oft starten, wie sie möchten, es wird jeweils unter einer neuen “trial number” gespeichert und sie können sich mit “next trial” und “last trial” die verschiedenen Messungen ansehen. Wenn Sie eine besonders schöne Messung haben, die Sie gerne als Abbildung ins Praktikumsprotokoll übernehmen möchten, speichern Sie die Matlab-Abbildung ab.

Fragen:

1. Wie sieht das gemessene Signal aus?

2. Warum hat es nicht die identische Form wie der Stimulus?

3. Welcher Spannungswert wurde vor, während und nach der Stromstufe vom Computer aufgezeichnet? Welche Werte lesen Sie vom Oszilloskop ab?

4. Wie kommen die gemessenen Werte zustande?

5. Voraussichtlich sind die Werte nicht ganz konstant. Vergrößern Sie die Abbildung der Messdaten soweit, dass Sie die Schwankungen der Werte erkennen können. Wie stark schwanken sie? Gibt es Unterschiede zwischen den Schwankungen vor, während und nach der Stromstufe?

6. Verändern Sie die Zeitachse der Abbildung. Können Sie dann eine zeitliche Struktur des “Rauschens” erkennen?

7. Was erwarten Sie, wenn Sie den Schalter der Modellzelle auf 20 MΩ, 500 pF umstellen, so dass ein “großes Neuron” simuliert wird: wird das gemessene Signal größer oder kleiner? Überprüfen Sie Ihre Prädiktion experimentell.

8. Warum sollten Sie die BRIDGE BALLANCE für die Versuche mit der Modellzelle auf 0 zurückdrehen? Was passiert, wenn diese verstellt ist?

4.4 Modellzellen-Experiment 2

Diese Übung ist Pflicht, muss aber nicht ins Protokoll.
Um den Umgang mit dem Stimulationsprogramm zu üben, sollten Sie ein wenig mit der Modelzelle “spielen”. Sie können dabei gerne ausprobieren, was Sie möchten, allerdings sollten niemals mehr als 5 nA injeziert werden. Beispeilsweise könnten Sie ausprobieren:

- Ein 10 s langer Sinus-Stimulus mit einer Amplitude von 2 nA.
- Ein 60 s langer Stimulus mit 5 jeweils 10 s langen Pulsen von 3 nA.
- Eine 30 s lange “Treppe”, bei der von 0 nA anfangend jeweils nach 5 s der Strom um 0.5 nA zunimmt.
- Ein 60 s langer Stimulus, der nach 10 s von 0 nA als Rampe in 40 s auf -3 nA abfällt.
- Ein 10 s langer Stimulus, der jeweils nach 1 s für 10 ms von 0 nA auf 2 nA springt.
- Probieren Sie auch aus, den gleichen Stimulus mehrfach zu präsentieren und zwischendurch jeweils für 10 s zu warten. (Indem Sie bei “repetitions” auf “change” klicken, knnen Sie die Anzahl der Wiederholungen des aktuellen Reizes einstellen und wenn Sie bei “pause” auf “change” klicken, stellen Sie die Pause zwischen diesen Wiederholungen ein.)

Fragen:

1. Was passiert, wenn eine sehr kurze Stromstufe injeziert wird?

2. Überlegen Sie sich eine Versuchsreihe, um mit der Modellzelle ein “großes” mit einem “kleinen” Neuron bezüglich ihre zeitlichen Antworteigenschaften zu vergleichen.

5 Vorbereitung eines elektrophysiologischen Experiments

Die meiste Zeit des Praktikums werden Sie damit verbringen, einzelne Intrazellulärableitungen von Neuronen des Blutegels durchzuführen. Für jedes dieser Experimente sind folgende Vorbereitungen zu treffen:

5.1 Ringer

Überprüfen Sie, ob genug Ringer vorhanden ist (mindestens 1 l gekühlter Ringer und 100 ml bei Zimmertemperatur). Wenn nicht, bereiten Sie Ringer zu:

Substanz	g / 2 l	entspricht mM
H_2O	2 l	
$NaCl$	13.42 g	115 mM
KCl	0.6 g	4 mM
$CaCl_2 * 2H_2O$	0.54 g	1.8 mM
$MgCl_2 * 6H_2O$	0.6 g	1.5 mM
$Glucose$	3.6 g	10 mM
$TrisMaleat$	2.2 g	4.6 mM
$TrisBase$	1.3 g	5.4 mM

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7.4 eingestellt, indem Sie mit einer Pipette 1 M NaOH zugeben. Tasten Sie sich mit einzelnen Tropfen an den Wert heran. Falls doch eine Korrektur nach unten nötig ist, wird dafür 1 M HCl verwendet.

5.2 Vorbereitung eines Blutegels

1. Besorgen Sie eine Schüssel Eiswürfel.
2. Füllen Sie ein Becherglas mit Eiswürfeln und di Wasser (Kran).
3. Stellen Sie eine Flasche Ringer aus dem Kühlschrank in das restliche Eis.
4. Fangen Sie einen Blutegel mit einem Netz aus dem Aquarium und legen ihn für ca. 5 Minuten in das Eiswasser, um ihn zu betäuben. (Achtung, auch leicht gekühlte Blutegel können erstaunlich mobil sein.) Bitte stellen Sie sicher, dass das Aquarium wieder fest geschlossen ist! Spülen Sie das Netz gut aus und hängen es zum Trocknen auf.
5. Holen Sie eine Präparationsschale aus dem Gefrierfach und füllen das Wachsbett zu ca. 2/3 mit Ringer aus dem Kühlschrank. Überprüfen Sie, ob mindestens 10 Stecknadeln und 2 große Nadeln im Wachsbett stecken.
6. Legen Sie den Blutegel in den Ringer im Wachsbett.
7. Stellen Sie eine kleine Petrischale mit Sylgardboden, mindestens 12 feinen Drahtnadeln und Ringer bei Raumtemperatur bereit.

5.3 Präparation

1. Mit einer grossen Nadel das Hinterende feststecken.
2. Mit der zweiten grossen Nadel das Vorderende langziehen und feststecken. Die grüngemusterte dorsale Seite muss oben liegen.
3. Mit einem Skalpell oder einer großen Schere genau in der Mitte des Rückens einen Schitt ziehen.
4. Den Muskelschlauch auseinanderziehen und seitlich mit Stecknadeln feststecken.
5. Blut absaugen (das wird während der Präparation immer wieder nötig) und bei Bedarf kalten Ringer nachfüllen (das Gewebe darf nie trockenfallen).
6. Binokkular den eigenen Augen entsprechend anpassen und auf das gewünschte Ganglion fokussieren.

7. Muskel- und Fettgewebe über dem ausgewählten Ganglion und seinen Haupt- und Seitennerven mit Pinzette und feiner Schere entfernen. *Achtung! Die feinen Scheren sind empfindlich und teuer! Bitte lassen Sie sie nicht fallen und benutzen Sie sie ausschliesslich für feine Schneidarbeiten, nicht für die Haut, grobe Muskeln etc.*

8. Feines Blutgefäßgeflecht über dem Ganglion mit einer feinen Pinzette und der feinen Schere der Länge nach aufschneiden, dabei oben und unten jeweils den Schnitt um etwa die Breite des Ganglions fortsetzen.

9. Das Ganglion von den Blutgefäßen freischneiden, aber genug zum späteren Fixieren übriglassen.

10. Mit der feinen Schere unter dem Ganglion durch die Blutgefäße aufschneiden.

11. Nochmal Blut absaugen, wenn das Ganglion locker wird, ist das zu riskant, es zu verlieren.

12. Die Seitennerven durchschneiden, etwa die Breite eines Ganglions stehenlassen.

13. Die Hauptnerven ungefähr auf halbem Weg zum nächsten Ganglion durchschneiden, um genug Platz zum Feststecken zu lassen.

14. Mit der Pinzette am Ende eines Hauptnerven das Ganglion festhalten und in die bereitgestellte Petrischale überführen.

15. Mit der feinen Pinzette einen Hauptnerv am Rand festhalten und mit der groben Pinzette eine feine Drahtnadel durch den Nerven stechen und im Sylgard feststecken.

16. Ganglion am anderen Hauptnerven etwas in die Länge ziehen und dort ebenfalls feststecken. Achten Sie darauf, dass die ventrale Seite des Ganglions oben ist, so dass man die beiden Retzius-Zellen sieht. Wenn das Ganglion anders aussieht als auf Abb. 4 liegt es wahrscheinlich mit der dorsalen Seite nach oben und muss umgedreht werden. Tipp: die Hauptnerven krümmen sich meistens zur dorsalen Seite hin, bevor sie befestigt werden.

17. Seitlich entweder an den Blutgefäße oder den Seitennerven mit ein oder zwei Nadeln pro Seite feststecken.

18. Ganglion “waschen”, indem jeweils ein Teil des Ringers mit einer Pipette rausgesaugt und durch frischen Ringer (Raumtemperatur) ersetzt wird.

19. Präparationsbesteck gut mit di Wasser abspülen, mit weichem Tuch trockentupfen und sicher verstauen.

20. Zum Ausschalten der Absaugpumpe zuerst den Schalter am Handstück feststellen.

5.4 Vorbereitung der Instrumente

1. Der Verstärker sollte sich vor der Benutzung mindestens 20 Minuten aufwärmen, schalten Sie ihn deshalb schon während der Präparation ein.

2. Füllen Sie mehrere der bereitgestellten Mikropipetten etwa zur Hälfte mit 3 M KAc Lösung und lassen Sie sie mit der Spitze schräg nach unten für mindestens 5 Minuten ruhen. *Achtung! Die Spitzen der Mikropipetten sind extrem empfindlich! Wenn sie berührt werden, brechen sie sofort ab und sind unbrauchbar.* Falls unten eine Luftblase bleibt, ist das nicht tragisch, ein feines Filament stellt sicher, dass die Lösung bis zur Spitze gelangt.
3. Überprüfen Sie, ob alle Achsen des Mikromanipulators sich ungefähr in mittlerer Stellung befinden.
4. Stellen Sie die Petrischale mit dem Präparat in den Petrischalentisch.
5. Fokussieren Sie mit niedriger Vergrößerung auf das Ganglion.
6. Platzieren Sie den Petrischalentisch so, dass das Ganglion genau in der Mitte Ihres Sichtfeldes sieht. (Überprüfen Sie das durch Umschalten auf hohe Vergrößerung.)
7. Stellen Sie das Dunkelfeld so ein, dass das Ganglion dunkel und von einem hellen Ring umgeben ist.
8. Schauen Sie mit größerer Vergrößerung nach, ob wirklich die ventrale Seite des Ganglions nach oben zeigt (Vergleich mit Abb. 4 und ob Sie einzelne Zellen erkennen können. (Wenn Sie sich nicht sicher sind, zögern Sie bitte nicht zu fragen!). Wechseln Sie dann wieder zurück auf niedrige Vergrößerung.
9. Führen Sie vorsichtig den Silberdraht des Elektrodenhalters in eine Mikropipette ein und schrauben die Pipette am Elektrodenhalter fest. *Achtung! Die Ag/AgCl Beschichtung des Drahtes darf nicht verkratzen! Wenn der Draht silbrig schimmert, muss er zuerst neu chloridiert werden!*
10. Schieben Sie den Elektrodenhalter in den BNC-Verbinder des Messkopfes.
11. Befestigen Sie die indifferente Elektrode mit Knetgummi so am Petrischalentisch, dass nur das Ag/AgCl Pellet in den Ringer eintaucht.
12. Senken Sie die Spitze der Mikropipette in der Nähe des Ganglions vorsichtig in den Ringer.
13. Schalten Sie das Oszilloskop und den Computer an.
14. Überprüfen Sie die im Abschnitt 4.2 aufgelisteten Einstellungen der Kippschalter.
15. Stellen Sie mit dem “OFFSET” Regler (29) den vom Verstärker angezeigten Spannungswert auf 000.
16. Drücken Sie den “ELECTRODE RESISTANCE” Schalter (10). Notieren Sie den angezeigten Elektrodenwiderstand (14). Wenn dieser weit von den sonst üblichen Werten abweicht oder wenn sich auf dem Oszilloskop ungewöhnlich großes Ableitrauschen zeigt, verwerfen Sie die wahrscheinlich schadhafte Mikropipette und nehmen eine neue.
17. Kompensieren Sie die Kapazität mit “CAPACITY COMPENSATION” (30) (siehe oben, Abb. 7).
18. Stellen Sie die “BRIDGE BALANCE” (27) ein (s.o., Abb. 8).

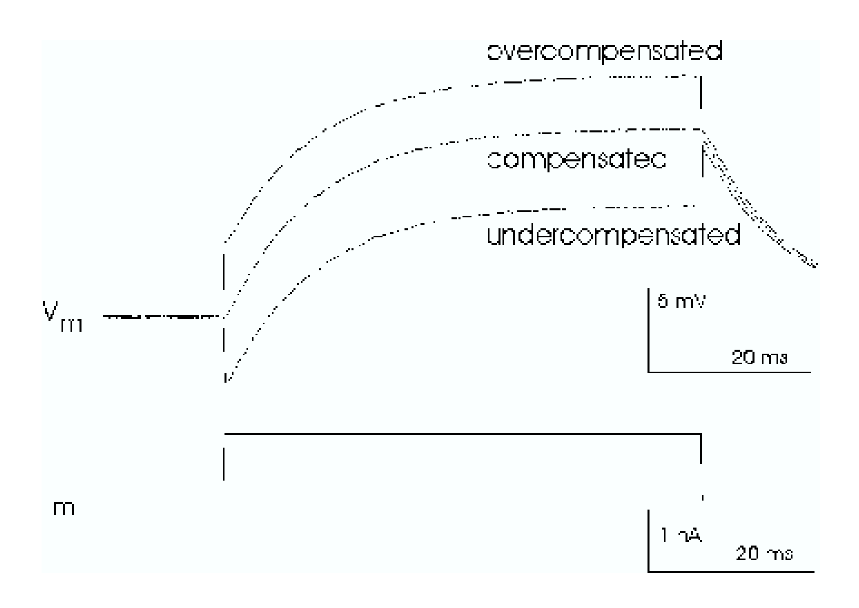


Figure 11: Adjustment of the bridge balance after penetrating a cell

Abbildung 9: Einstellung der Brücke während einer Intrazellulärableitung. (Aus dem Verstärker-Handbuch)

19. Fahren Sie die Spitze der Mikropipette mit dem Mikromanipulator nah an das Ganglion heran, ohne es zu berühren.

20. Wählen Sie eine hohe Vergrößerung, so dass (fast) nur noch das Ganglion zu sehen ist.

5.5 Versuchsdurchführung

1. Fahren Sie bei großer Vergrößerung die Spitze der Mikropipette ganz nah an die gewünschte Zelle heran. Zielen sie auf die Mitte des als Kreis sichtbaren Zellkörpers.

2. Setzen Sie die Pipettenspitze vorsichtig mit dem Feintrieb auf die Zellmembran auf.

3. Um die Zellmembran zu durchstoßen gibt es zwei Methoden. Entweder sie tippen leicht(!) mit dem Finger an den Mikromanipulator. Oder Sie drücken kurz den “BUZZ” Schalter (8), was zu einer starken Oszillation des Elektrodenpotentials führt.

4. Wenn sie auf dem Oszilloskop einen plötzlichen Abfall des Potentials um 10 oder mehr mV beobachten, ist die Elektrodenspitze in der Zelle. Wahrscheinlich können sie dann auch spontane Aktionspotentiale sehen.

5. Warten Sie dann ein Paar Minuten, bis sich das Membranpotential stabilisiert hat, bevor Sie die eigentlichen Messungen beginnen.

6. Überprüfen Sie bei jedem Experiment, bei dem Sie eine Stromstufe injezieren, ob Bridge Balance (27) und Kapazitätskompensation (30) noch in Ordnung sind. Es ist üblich, in einem Stimulusprotokol vor der eigentlich interessierenden Stimulation extra zu diesem

Zweck und zur Überprüfung, ob der Eingangswiderstand der Zelle konstant bleibt, einen schwachen Rechteckpuls zu geben, z.B. 500 ms -0.5 nA. Versuchen Sie, sich beim Abgleich an Abbildung 9 zu orientieren - tatsächlich ist dies eine sehr schwierige Aufgabe, die sehr viel mehr Erfahrung erfordert, als Sie sie im Rahmen des Praktikums erlangen können.

7. Falls das Membranpotential gegen 0 driftet, rutscht wahrscheinlich gerade die Mikropipette aus der Zelle. Versuchen Sie, diese durch eine minimale Bewegung mit dem Mikromanipulator tiefer in die Zelle zu befördern.

8. Wenn Sie eine Zellmembran durchbrochen haben und die Pipette wieder aus der Zelle gerutscht ist, fahren Sie die Elektrodenspitze ein Stück weit von den Zellen weg. Überprüfen Sie, ob der Offset (29) der Elektrode nachreguliert werden muss, ob die Elektrode noch den selben Widerstand (10, 14) hat (Abweidungen bis 20% sind ok) und ob BRIDGE BALLANCE (27) noch richtig eingestellt ist. Kommt es zu großen Änderungen, können Sie versuchen, die Pipette mit ELECTRODE CLEAR (5) zu reinigen. Wenn das nicht funktioniert, ist sie entweder zu sehr mit einem Stück Membran verstopft, oder abgebrochen und muss ersetzt werden.

9. Wenn Sie mit der Elektrode aus der Zelle rutschen oder das Experiment beenden, notieren Sie bitte, ob das “Rauschen” größer geworden ist und den Potentialwert, den der Verstärker als Ruhewert anzeigt. Nur dadurch können Sie im Nachhinein auf die Qualität Ihrer Ableitungen zurückschliessen.

10. Tauschen Sie den Ringer in der Petrischale aus, wenn die Spitze einer Mikropipete abbricht, weil sonst die KAc-Lösung der Pipette die Salz-Konzentration des Ringers verändert.

11. Achten Sie darauf, dass Ihnen keine Daten verlorengehen, speichern Sie alle Messdaten ab!

6 Charakterisierung von Neuronen des Blutegels

Für das Protokoll erwarte ich, dass Sie mindestens drei verschiedene Zellen qualitativ charakterisieren.

Bei diesem Praktikumsteil geht es darum, mehrere einzelne Neurone des Blutegels abzuleiten und elektrophysiologisch zu charakterisieren. *Sobald Sie ein wenig Übung im Ableiten haben, bietet es sich an, die Charakterisierung eines Neurons mit einem der Experimente aus Abschnitt 7 zu kombinieren.*

Wichtige Parameter zur Bestimmung des Zelltyps sind:

Position des Zellkörpers: Die meisten Neuronen des Blutegels lassen sich alleine auf Grund der Position ihres Zellkörpers relativ zu den anderen Zellen im Ganglion bestimmen. Deshalb sucht man die Zelle, von der man ableiten möchte durch den optischen Vergleich mit dem in Abb. 4 gezeigten “Stadtplan”, auf dem eine Reihe gut ableitbarer Zellen verzeichnet sind.

Ruhepotential: Das Ruhepotential, das sich während der Intrazellulärbleitung einstellt, wenn nicht stimuliert wird, hängt vom Zelltyp ab.

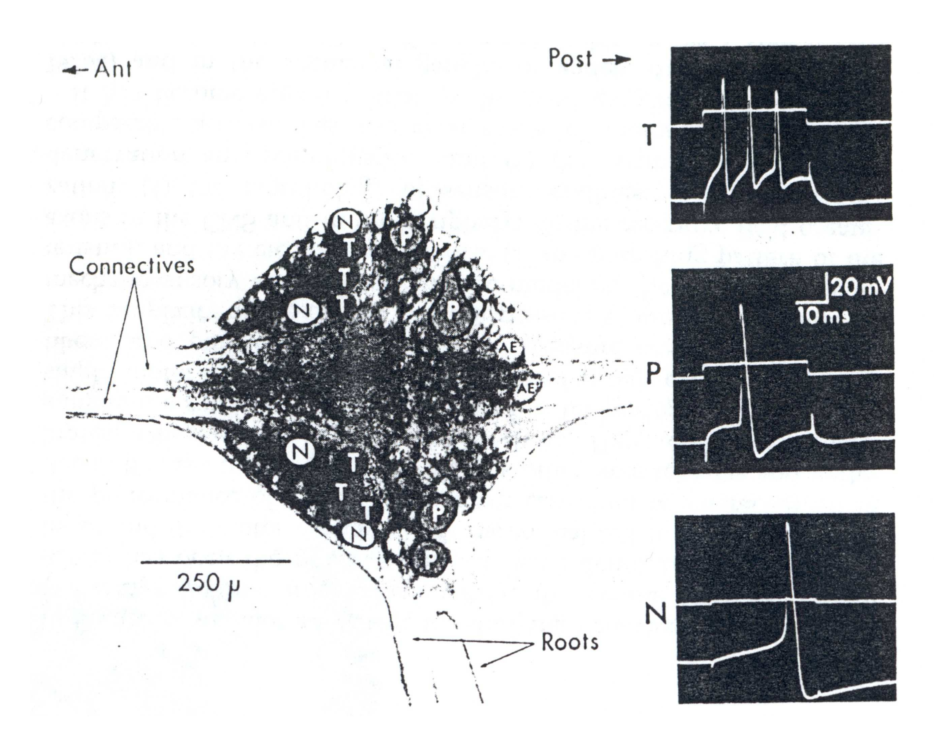


Abbildung 10: Beispiel für die AP-Formen von drei verschiedenen Zelltypen des Blutegels. Aus “Neurobiology of the leech”

Spontanaktivität: Manche Zellen, die nicht elektrisch stimuliert werden und deren Membranpotential somit beim Ruhepotential liegt, produzieren fortwährend Aktionspotentiale, während andere Neurone “still” sind. Allerdings hängt dieses Kriterium stark von der Ableitqualität und vom Zustand des Präparates ab, durch die Verletzung der Membran beim Einstich werden auch in “stillen Neuronen APs ausgelöst.

Eingangswiderstand: Wenn man in eine Zelle einen Strompuls injeziert, kann man mittels des Ohmschen Gesetzes den Widerstand der Zelle als $R = U/I$ ausrechnen (in Einheiten: $1m\Omega = 1mV/1nA$). Es bietet sich an, einen hyperpolarisierenden Puls zu nehmen, damit durch ihn keine aktiven Prozesse ausgelöst werden. Je größer ein Neuron ist, desto geringer ist sein Eingangswiderstand. (Achtung! Wenn die Bridge Balance nicht korrekt eingestellt ist misst man Artefakte der Elektrode mit.)

Größe und Form der Aktionspotentiale: Geübte Elektrophysiologen erkennen die verschiedenen Neuronen des Blutegels alleine am Aussehen der Aktionspotentiale. Man sollte auf die Höhe der APs (z.B. Motorneurone haben APs von 5 mV, während P-Zellen 50 mV depoalrisieren können), ihre Breite (häufig gemessen als Dauer des APs bei halber Maximalhöhe) und Form (z.B. Steigung der beiden Flanken, Länge und Amplitude der Nachhyperpolarisation) achten. Einige Beispiele sind in Abb. 10 gezeigt.

Reaktion auf langanhaltende depolarisierende Strompulse: Eine generelle Unterscheidung wird (nicht nur bei Blutegeln) zwischen tonischen und phasischen Zellantworten auf langanhaltende Depolarisation getroffen. Eine tonische Aktionspotential-Antwort dauert so lange wie der Stimulus, während eine phasiche Antwort nur transient am Anfang des Pulses auftritt. Diese Unterscheidung ist allerdings weniger eindeutig als sie klingt, da es sehr verschiedene Ausprägungen von phasischen Antworten gibt, so dass sie im Endef-

fekt ein Kontinuum hin zur phasischen Antwort bilden.

Reaktion auf langanhaltende hyperpolarisierende Strompulse: Insbesondere bei spontanaktiven Zellen ist es interessant zu untersuchen, wie diese auf langanhaltende negative Strompulse reagieren. Auch manche nicht oder wenig spontanaktive Zellen zeigen nach Ende der Hyperpolarisation sogenannte “Rebound-Spikes”, wenn sie zu ihrem Ruhepotential zurückkehren.

Morphologie: Die letzte Gewissheit, um welche Zelle es sich handelt, bekommt man durch eine Anfärbung. Diese werden wir im Rahmen des Praktikums aber nicht durchführen.

6.1 Aufgaben und Fragen:

1. Entwickeln Sie ein Protokoll, das die Charakterisierung von Zellen anhand der oben genannten Kriterien Position, Ruhepotential, Spontanaktivität, Eingangswiderstand, Form der APs und Reaktion auf lange Strompulse ermöglicht.

2. Leiten Sie im Laufe des Praktikums von mindestens drei verschieden Zelltypen des Blutegels ab und charakterisieren sie auf der Grundlage dieser Kriterien. Besonders geeignet sind dafür die in Abbildung 4 mit einem Kürzel versehenen Zellen. Der am einfachsten Abzuleitende und zu charakterisierende Zelltyp ist die Retziuszelle (RZ), die Sie als erstes Untersuchungsziel anpeilen sollten.

3. Warum ist eine hohe Samplerate erforderlich, um zuverlässig Zellen elektrophysiologisch zu charakterisieren?

4. Warum ist es wichtig, die Bridge Ballance während des Experiments regelmäßig zu überprüfen?

5. *Hinweis:* Wenn Sie eine gute Ableitung haben, können Sie die Zelle gleich für das Experiment zu Kodierung und Zuverlässigkeit verwenden. Erstellen Sie deshalb am besten frühzeitig ein Stimulusprotokoll für diesen Fragenkomplex und speichern es ab, so dass Sie es laden und benutzen können, sobald sich die Gelegenheit ergibt.

6.2 Auswertung:

Für die Charakterisierung von Neuronen reicht mir eine qualitative Auswertung, die auf kleinen Stichproben beruht. Wichtig ist allerdings, dass Sie diese als solche kennzeichnen (z.B. Mittelung über welchen Zeitraum, wieviele trials wurden benutzt, ggf. auch wieviele Zellen). Listen Sie für die verschiedenen Zelltypen auf:

Ruhepotential: Gemittelt über mindestens 100 ms neuronaler Antwort, wenn keine Reizung stattfindet. Besser ist natürlich, wenn die Mittelung über einen wesentlich längeren Zeitraum erfolgt oder mehrere trials benutzt werden (siehe Aufgaben 7). Es kann zu langsamen Schwankungen des Membranpotentials kommen (auch das wird unten diskutiert), deshalb sollten Sie das Ruhepotential mindestens am Anfang oder am Ende einer langen Messreihe bestimmen und miteinander vergleichen.

Spontanaktivität: Qualitativ ist wichtig, ob die Zelle in Abwesenheit eines Reizes nie, vereinzelt oder ständig Aktionspotentiale generiert. Bei stark spontanaktiven Zellen rechnen Sie bitte auch die Spikerate aus (siehe Aufgaben 7).Auch diese kann sich erheblich im Laufe eines Experiments ändern.

Eingangswiderstand: Berechnen Sie den Eingangswiderstand der Zelle anhand ihrer Reaktion auf einen hyperpolarisierenden Strompuls. Da der Eingangswiderstand ein gängiges Maš für die Ableitqualität ist, überprüfen Sie bitte, ob er sich zwischen Anfang und Ende Ihrer Messreihe ändert.

Größe und Form von Aktionspotentialen: Die Höhe und Dauer eines Aktionspotentials ist nicht ganz einfach zu messen, da man streng genommen Bezugspunkte festlegen muss, auf die sich die Messung bezieht. Auch hängt die Höhe eines Aktionspotentials davon ab, von welchem Membranpotential aus es startet. Wählen Sie sich am besten einen Stimulus aus, der bei allen von Ihnen abgeleiteten Zellen mindestens ein Aktionspotential ausgelöst hat und vermessen die Höhe des APs vom Ausgangspotential bis zur Spitze, die Breite des APs vom Start bis zum Einsetzen der Nachhyperpolarisation, die Höhe der Nachhyperpolarisation und die Länge der Nachhyperpolarisation, bis das Ausgangspotential wieder erreicht ist. Zeigen Sie für die verschiedenen Zellen jeweils mindestens ein Aktionspotential in hoher Vergrößerung in einer Abbildung.

Phasisch / Tonisch Zeigen Sie für jede abgeleitete Zelle eine Beispielantwort auf einen langanhaltenden (mind. 100 ms) Strompuls (bzw die Antworten auf Ihr gesamtes Stimulusprotokoll). Klassifizieren und begründen Sie, ob es sich um eine phasische oder eine tonische Antwort handelt. Wenn Sie mit Reizen verschiedener Stärke gearbeitet haben, nehmen Sie auch Stellung dazu, ob das phasische bzw tonische Verhalten von der Reizstärke abhängt.

Rebound-Spikes Notieren Sie im Protokoll, ob Sie im Anschluss an eine Hyperpolarisation Rebound-Spikes beobachten.

Für diesen Praktikumsteil bietet es sich an, die Ergebnisse für die verschiedenen Zellen gegeneinanderzustellen, beispielsweise als Tabelle. Für die Diskussion sollten Sie die Zelltypen vergleichen und zu versuchen, einen Bezug zu ihrer Funktion herzustellen.

7 Kodierung und Zuverlässigkeit neuronaler Antworten

Für das Protokoll erwarte ich, dass Sie die Antworteigenschaften einer Zelle anhand von mindestens 10 (besser mehr) Antworten auf wiederholte gleiche Stimulation quantitativ auswerten. Das klassische Bild der Aufgabe von Nervenzellen ist, dass sie Informationen über die sensorische Umwelt übertragen. Bereits in den frühen Anfängen der Elektrophysiologie vor 75 Jahren ist festgestellt worden, dass ein sensorisches Neuron umso mehr Aktionspotentiale generiert, je stärker ein Reiz ist. Inzwischen hat sich für viele neuronale Systeme jedoch herausgestellt, dass dieses als “Ratencode” bezeichnete Prinzip nicht zur Kodierung der sensorischen Information ausreicht, sondern dass auch die genauere zeitliche Struktur der neuronalen Antworten eine Rolle spielt. Allerdings wird die Verwendung einer Kodierung durch AP-Zeitpunkte dadurch erschwert, dass eine Nervenzelle nicht in immer gleicher Weise auf einen wiederholten gleichen Stimulus reagiert. Tatsächlich kann die Variabilität der Antworten ganz erheblich sein, teilweise größer als die mittlere Antwort. Es ist eine der großen Fragen der Neurowissenschaften, wie Nervensysteme trotz ihrer unzuverlässigen “Bauelemente” zuverlässige Verhaltensantworten generieren können. Diese Unzuverlässigkeit der neuronalen Antworten zeigt sich nicht nur bei “natürlicher” Stimulation, also z.B. der Reaktion auf eine Lichtreiz oder einen Druck auf die Haut, sondern auch bei der wesentlich besser kontrollierbaren elektrischen Stimulation einzelner Nervenzellen (wenn auch in geringerem Maße).

7.1 Parameter und Werkzeuge zur Untersuchung der Kodierung und Zuverlässigkeit neuronaler Antworten

Bestimmung von AP-Zeitpunkten: Ausgehend von der Annahme, dass APs stereotyp sind und es somit nur darauf ankommt, ob ein AP generiert wird ("Alles-oder-nichts-Prinzip") werden elektrophysiologische Meßdaten häufig insofern vereinfacht, als nur die Zeitpunkte des Auslösens von Aktionspotentialen betrachtet werden. Dieses Verfahren eliminiert jegliche Information über die APs selber (Amplitude, Form, Dauer) als auch über den Verlauf des Membranpotentials zwischen den APs. Die einfachste Methode zur Generierung solcher AP-Folgen ist ein Schwellwert, bei dessen Überschreiten der Wert als "1" definiert wird und sonst als "0" (egal, ob die Zelle am Ruhepotential oder um viele mV depolarisiert ist).

Rasterplot Wenn man die Antworten einer Nervenzelle auf mehrere Präsentationen des gleichen Reizes darstellen möchte, verwendet man häufig Rasterplots, bei denen Präsentationen gegen Zeit aufgetragen werden. Jede Präsentation wird als eine Zeile dargestellt, in der die Zeitpunkte des Auftretens von APs mit einem kleinen senkrechten Strich (oder auch nur einem Punkt) markiert sind. Da alle Antworten untereinander dargestellt werden, kann man sehen, ob die Antworten im Verlauf des Experiments ihre Eigenschaften geändert haben und ob es eine starke Streuung zwischen den einzelnen Antworten gibt.

Bestimmung der AP-Rate AP-Raten sind die gängigste Auswertungsart neuronaler Aktivität. Eine AP-Rate ist die mittlere Anzahl APs, die in einer bestimmten Zeitspanne generiert werden. Die dafür verwendete Einheit ist APs/sek. Es muss ein Zeitfenster festgelegt werden, um AP-Raten zu bestimmen. Die Wahl dieses Zeitfensters ist ein kritischer Parameter, denn wählt man das Fenster zu groß, sind schnelle Änderungen der Antworten unsichtbar, ist es zu klein, verliert man den Überblick über die grobe Antwortstruktur. Da es sich bei der Bestimmung der AP-Rate um eine zeitliche Mittelung handelt, kann sie selbst dann angewendet werden, wenn ein Stimulus nur einmal präsentiert wurde.

Über Präsentationen gemittelte Antwort und Peri Stimulus Time Histogram: Da die Antworten neuronaler Systeme auf sensorische oder elektrische Reize variabel sind, ist es in den Neurowissenschaften üblich, den gleichen Reiz mehrfach zu präsentieren und dann über die aufgenommenen Antworten zu mitteln. Häufig wird zusätzlich eine zeitliche Mittelung der Signale vorgenommen, also in der Regel AP-Raten verwendet. Ziel des Verfahrens ist es, einen Verlauf der Antwort zu erkennen, der die "typische" Reaktion auf den Stimulus widerspiegelt. Diese Methode kann auf die Rohdaten angewandt werden und ergibt dann die "gemittelte Antwort". Auf binäre AP-Folgen bezogen spricht man von "PSTH" (Peri Stimulus Time Histogram), bei dem die Häufigkeiten aufgetragen werden, wieviele Spikes in bestimmten Zeitfenstern relativ zum Stimulus generiert wurden.

Varianz der Antworten auf wiederholte Präsentationen: Ausser dem Mittelwert der Spikerate (oder auch des Membranpotentials) in Reaktion auf einen Reiz kann auch die Standardabweichung, also die Streuung der Einzelantworten um den Mittelwert für verschiedene Bedingungen berechnet werden. Z.B. ist es interessant zu vergleichen, ob die Antworten während der Stimuluation mehr streuen als beim Ruhezustand der Zelle.

Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Antworten: Bei schwachen Reizen, z.B. kurzen Strompulsen mit niedriger Amplitude wird nicht unbedingt jedesmal eine Antwort ausgelöst. Deshalb ist es interessant, die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Antwort

auf verschiedene Stimulusbedingungen zu vergleichen. Auch ist es für die Interpretation von Messdaten wichtig zu wissen, in wieviel Prozent der Fälle überhaupt eine Antwort erfolgt.

Antwortlatenz und zeitliche Präzision: In vielen sensorischen Systemen wird das erste Aktionspotiential der Antwort umso früher generiert, je stärker der Reiz ist. Es gibt Hinweise darauf, dass die als "Latenz" bezeichnete Zeitspanne zwischen Beginn des Reizes und Beginn der Antwort genutzt werden kann, um schnell von der neuronalen Antwort auf den Reiz zurückzuschliessen. Allerdings tritt das erste AP nach Reizbeginn nicht immer exakt zum selben Zeitpunkt auf, weshalb neben der mittleren Antwortlatenz auch die Streuung um diesen Mittelwert betrachtet wird. Diese ist ein Maß für die zeitliche Präzision der Antwort.

7.2 Aufgaben:

Für den Bereich der neuronalen Kodierung spielt die Datenauswertung meist eine größere Rolle als die experimentelle Messung. Entsprechend werden auch Sie voraussichtlich einige Zeit für die Auswertung benötigen, bitte planen Sie dafür einige Stunden bei Ihrer Zeitplanung ein. Die notwendigen Methoden werde ich im Detail mit Ihnen besprechen, wenn Sie die Daten erhoben haben. Die Messung für diesen Fragenkomplex lässt sich gut mit den Versuchen zur Charakterisierung von Neuronen kombinieren, wenn Sie rechtzeitig das Stimulusprotokoll vorbereiten.

1. Erstellen Sie ein Protokoll, das aus mehreren längeren Pulsen verschiedener Amplitude aber gleicher Länge (z.B. 500 ms) mit Ruhepausen dazwischen besteht. Verwenden Sie sowohl De- als auch Hyperpolarisation.
2. Bereiten Sie das Experiment in gleicher Weise vor, wie in Kapitel 6 beschrieben.
3. Leiten Sie von einer Zelle Ihrer Wahl ab und versuchen Sie, möglichst viele Durchläufe mit dem gleichen Protokoll aufzunehmen (mindestens 10), wobei Sie jeweils zwischen den Druchläufen mindestens 10 s warten sollten.

7.3 Auswertung:

Rasterplot: Wandeln Sie die gemessenen Signale in AP-Folgen um. Sehr kritisch ist die von Ihnen gewählte Schwelle zur Bestimmung der APs. Überprüfen Sie, ob die vom Programm gefundenen APs mit Ihrem "Augenmaß" übereinstimmen, wo sich APs befinden. Erstellen Sie einen Rasterplot sämtlicher Antworten. Zeigen Sie im Protokoll ausser diesem Rasterplot auch ein Einzelbeispiel für eine Antwortspur.

mittlere Antwort und PSTHs Erstellen Sie die über alle Präsentationen (ausser solchen, bei denen das Membranpotential sehr stark driftet, weil die Elektrode au der Zelle gerutscht ist) gemittelte Antwort und eine Reihe von PSTHs, wobei Sie das Zeitfenster variieren (z.B. 1 ms, 5 ms, 10 ms, 50 ms, 100 ms). Wie unterscheiden sich die mit verschiedenen Zeitfenstern generierten PSTHS? Warum? Übernehmen Sie ins Protokoll ein PSTH mit einem "sinnvollen" Zeitfenster.

Membranpotentialantwort in Abhängigkeit von der Reizstärke Berechnen Sie das mittlere Membranpotential im Ruhezustand und in Antwort auf die verschiedenen Pulse (gemittelt über den jeweiligen Zeitraum und alle Präsentationen). Berechnen Sie auch die zu-

gehörigen Standardabweichungen über die Präsentationen. Tragen Sie Mittelwerte und Standardabweichungen des Membranpotentials gegen die Reizstärke auf.

Spikeanzahlen in Abhängigkeit von der Reizstärke Berechnen Sie für jede Reizstärke und für den Ruhezustand die im Mittel über alle Präsentationen generierte Spikeanzahl und ihre Standardabweichung. Tragen Sie diese gegen die Reizstärke auf.

Antwortlatenz in Abhängigkeit von der Reizstärke Berechnen Sie für die verschiedenen Reizstärken den mittleren zeitlichen Abstand zwischen Reizbeginn und erstem Spike und seine Standardabweichung. Tragen Sie Mittelwert und Standardabweichung der Latenz gegen die Reizstärke auf.

Antwortwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Reizstärke Berechnen Sie für jede Reizstärke und Ruhe den Prozentsatz der Präsentationen, in denen mindestens ein Spike generiert wurde und tragen diesen gegen die Reizstärke auf. (Diese Angaben sind sehr wichtig, um die Graphen zur Spikeanzahl und zur Antwortlatenz richtig interpretieren zu können.)

Stabilität der Ableitung Um zu sehen, ob es langfristige Änderungen der gemessenen Zelleigenschaften gibt, berechnen Sie für jede Reizpräsentation einzeln das Ruhepotential, den Eingangswiderstand, die Anzahl APs in Antwort auf einen von Ihnen ausgewählten Strompuls und die Antwortlatenz bei einem ausgewählten Strompuls. Tragen Sie die Werte jeweils gegen die Nummer des trials auf. Interpretieren Sie, ob es “drifts” oder “Ausreisser” gibt und was dafuer der Grund sein könnte.

8 Bestimmung der Spikeschwelle

Für das Protokoll erwarte ich, dass Sie entweder eine Zelle genauer charakterisieren (wobei auch andere Projekte als das hier vorgestellte möglich sind), oder die synaptische Übertragung eines Zellpaares untersuchen (Aufgaben 9).

Ziel dieses Experimentes ist es, den Membranpotentialwert zu bestimmen, bei dem eine Zelle Ihrer Wahl ein Aktionspotential auslöst.
Dieses Projekt kann ebenfalls “nebenbei” erledigt werden, indem Sie es mit der Charakterisierung eines Neurons zu verbinden, wenn Sie rechtzeitig die nötigen Vorkehrungen treffen.

1. Bereiten Sie ein Protokoll “Treppe” vor, bei dem der injezierte Strom von -3 nA bis +3 nA in jeweils 200 ms langen Stufen in 0.25 nA Schritten ansteigt.

2. Erzeugen Sie ausserdem zwei weitere Protokolle “kurzeRampe”, bei dem eine Rampe im gleichen Zeitraum wie bei “Treppe” von -3 nA auf +3 nA ansteigt und “langeRampe”, die in der dreifachen Zeit den gleichen Strombereich abdeckt.

3. Erzeugen Sie ein Protokoll “Spruenge”, bei dem ausgehend von einer konstanten Hyperpolarisation um -3 nA jeweils nach 200 ms einen 10 ms Rechteckpuls gibt, wobei die Amplitude der Rechteckpulse von -2.75 nA (also 0.25 nA Depolarisation gegenüber dem Haltewert von -3 nA) bis +3 nA in Schritten von 0.25 nA ansteigt.

4. Leiten Sie von einer Zelle Ihrer Wahl ab.

5. Präsentieren Sie den Stimulus “Treppe” 10 mal.

6. Präsentieren Sie anschliessend entweder die beiden Rampen jeweils 10 mal oder die Spruenge. (Natürlich können Sie gerne auch beide Stimulationsarten ausprobieren, wenn die Ableitung noch stabil ist.)

7. Wenn die Ableitung noch stabil ist, führen Sie mehr Präsentationen der verschiedenen Stimuli durch. (Hier gilt wie bei den Experimenten zu Kodierung und Zuverlässigkeit: je mehr desto besser.)

8. Wenn Sie es ganz genau wissen wollen: Untersuchen Sie den Membranpotentialbereich, der sich im Mininalprojekt als relevant für die Spikeschwelle herausgestellt hat, nochmal genauer mit einer “Stromtreppe” mit Stufen von kleinerer Amplitude. (Diese Aufgabe klingt einfach, ist aber relativ schwierig, wenn das Membranpotential driftet. Sagen Sie bitte bescheid, wenn Sie Hilfe brauchen.)

8.1 Auswertung

Bestimmen Sie für jede Präsentation der “Treppe” den Wert des injezierten Stroms und den dadurch bedingten Membranpotentialwert, bei dem das erste Aktionspotential ausgelöst wird.

Bestimmen Sie Mittelwert des Membranpotentialwerts, bei dem das erste AP ausgelöst wird.

Bestimmen Sie Latenz und zeitliche Präzision des Auftretens des ersten Spikes nach Beginn der entsprechenden Stromstufe.

Wenn Sie die “Sprünge” als weitere Stimulation verwendet haben, werten Sie diese Daten in gleicher Weise aus wie die Ergebnisse des Protokolls “Treppe”.

Wenn Sie die beiden “Rampen” verwendet haben, bestimmen Sie ebenfalls für jede Präsentation Membranpotential und Stromwert bei Auslösung des ersten Aktionspotentials (Latenz macht hier keinen Sinn), und ermitteln Mittelwert und Standardabweichung.

Vergleichen Sie die Ergebnisse der verschiedenen Reizprotokolle. Ermitteln Sie die gleiche Schwelle? Wenn nein, woran koennte das liegen?

Die mit der “Treppe” erzeugten Messdaten eignen sich auch zu einer genaueren Bestimmung des Eingangswiderstandes der Zelle. Berechnen Sie für jede Präsenstation und jede Stimulusstärke den Eingangswiderstand mit dem Ohmschen Gesetz (Achtung, nur “steady state” verwenden.) Berechnen Sie für jede Stimulusstärke den mittleren Widerstand und seine Standardabweichung über die Präsentationen. Tragen Sie Mittelwert und Standardabweichung gegen die Stimulusstärke auf. Hängt der Eingangswiderstand von der Stimulusstärke ab?

9 Synaptische Übertragung

Für das Protokoll erwarte ich, dass Sie entweder eine Zelle genauer charakterisieren (Aufgaben 8), oder die synaptische Übertragung eines Zellpaares untersuchen.

Im Nervensystem des Blutegels können sowohl elektrische als auch chemische (inhibitorische und excitatorische) Synapsen relativ leicht abgeleitet werden. Ihr Effekt wird untersucht, indem man Intrazellulärableitungen von zwei Neuronen gleichzeitig durchführt und dabei jeweils eins der Neurone mit Strompulsen reizt und den beim anderen Neuron dadurch ausgelösten Effekt betrachtet.

9.1 Kriterien zur Unterscheidung elektrischer und chemischer Synapsen

Postsynaptische Potentiale: Zunächst muss der Nachweis erbracht werden, ob die beiden Zellen überhaupt miteinander gekoppelt sind. Dazu wird in eines der Neurone depolarisierender Strom injeziert. Wenn sich beim anderen eine De- oder Hyperpolarisation einstellt, die bei spontan aktiven Neuronen normalerweise mit einer Eröhung bzw Erniedrigung der Spikerate einhergeht, sind die beiden Neurone elektrisch gekoppelt.

Effekt präsynaptischer Hyperpolarisation: Wenn sowohl Depolarisation als auch Hyperpolarisation des präsynaptischen Neurons mit gleichem Vorzeichen an die postsynaptische Zelle weitergegeben werden, handelt es sich um eine elektrische Synapse.

Reziproker Einfluss: Elektrische Synapsen funktionieren normalerweise in beide Richtungen, während chemische Synapsen grundsätzlich gerichtet funktionieren. Allerdings kann es bei chemischen Synapsen Rückkopplung geben und rektifizierende elektrische Synapsen lassen depolarisierenden Strom nur in einer Richtung passieren (und hyperpolarisierenden in die andere).

Dynamische Änderung der Synapsenstärke: Die synaptische Stärke ist definiert als postsynaptischer Effekt / präsynaptischer Effekt. Elektrische Synapsen haben normalerweise eine relativ starre synaptische Stärke. Dagegen kann sich die Stärke chemischer Synapsen während eines Experiments stark ändern. Die am häufigsten zu beobachtende Änderung ist eine auf synaptische Ermüdung zurückzuführende Abnahme der Synapsenstärke nach starker oder lang andauernder präsynaptischer Stimulation. In manchen Fällen ist auch Fazilitation zu beobachten.

Synaptische Latenz: Ein sehr deutlicher Hinweis, ob es sich um eine chemische oder eine elektrische Synapse handelt, ist die Zeit zwischen präsynaptischem Aktionspotential und postsynaptischen Potential. Elektrische Synapsen sind sehr viel schneller als chemische, die für die Prozesse der Transmitterfreisetzung und -aufnahme mindestens 1 ms brauchen.

Umkehrpotential: Der Effekt von chemischen Synapsen beruht auf dem Fluss bestimmter Ionen, deshalb kann man für chemischen Synapsen ein Umkehrpotential bestimmen. Dazu wird für exzitatorische Synapsen das postsynaptische Membranpotential so weit depolarisiert, bis eine präsynaptischen Reizung nicht mehr zu einem postsynaptischen Effekt führt. Depolarisiert man die postsynaptische Zelle über diesen Wert hinaus, wirkt die Synapse hyperpolarisierend. Für inhibitorische Synapsen wird das postsynaptische Membranpotential entsprechend bis zum Umkehrpunkt hyperpolarisiert.

Pharmakologie: Ein schlagender (aber im Rahmen des Praktikums nicht zu erbringender) Nachweis für den vorliegenden Synapsentyp ist, mit welchen Chemikalien sich die jeweiligen Synapsen blocken bzw in ihrer Funktion verändern lassen (z.B. eine Hohe Mg-Konzentration im Ringer reduziert die Transmitterausschüttung).

Anatomie: Ein ebenfalls sehr zuverlässiger aber für das Praktikum zu weitreichender Nachweis elektrischer Koppelung ist das Füllen einer Zelle mit einem Farbstoff, der durch gap junctions in die elektrisch mit ihr verbundenen Zellen diffundiert. Auch können viele für gap junctions spezifische Proteine angefärbt werden.

9.2 Vorbereitung und Durchführung von Doppelableitung

Prinzipiell funktionieren Doppelableitungen genauso wie Einzelableitungen. Deshalb gehen Sie zur Vorbereitung der Doppelableitung genauso vor wie oben beschrieben.

Sie brauchen einen zweiten Mikromanipulator, der auf die andere Seite des Präparats gestellt wird und einen zweiten Verstärker mit Messkopf. Verbinden Sie den *Verstärker* genau wie oben beschrieben jeweils mit dem zweiten Kanal des Oszilloskops und des A/D Wandlers. Geerdet wird dar Messplatz nach wie vor durch den ersten Verstärker, und die indifferente Elektrode bleibt auch nur mit dem ersten Messkopf verbunden.

In der *Software* wählen Sie im Protocol Creator die Möglichkeit, zwei Zellen zu messen und zwei Stimuli zu geben. Sie können dann jeweils anwählen, welchen der beiden Stimuli Sie gerade verändern. Sowohl in der Vorschau als auch bei der Messung werden dann beide Kanäle in einer Abbildung angezeigt. Bereiten Sie Ihre Protokolle vor der eigentlichen Ableitung vor. Doppelableitungen sind mindestens doppelt so schwierig zu bekommen und meistens wesentlich instabiler als Einzelableitungen. Das macht die Messzeit zu kostbar, um sie mit Reizprogrammierung zu verkürzen.

Für die *Ableitung* fahren Sie zunächst beide Mikropipetten ganz nah an die beiden gewünschten Zellen heran, so dass Sie bei beiden "nur noch" durch Antippen oder buzzen die Membran durchbrechen müssen. Sehr häufig passiert es, dass durch die Erschütterung des Ganglions beim Durchbrechen der Kapsel um das Ganglion mit der zweiten Mikropipette die erste aus der Zelle rutscht. Stärke Bewegungen wie der Austausch einer der Pipetten führen ebenfalls sehr oft zum Ende der ersten Ableitung.

9.3 Charakterisierung von Synapsen

Wenn Sie im Rahmen des Praktikums eine elektrische Verbindung charakterisieren wollen, bietet es sich am meisten an, die beiden Retziuszellen gleichzeitig abzuleiten. Sie sind stark gekoppelt. Andere Möglichkeiten sind, von den beiden AE oder den beiden Lydig Neuronen abzuleiten.

Falls Sie lieber eine chemische Synapse studieren wollen, probieren Sie am besten eine Doppelableitung von P und AP, P und Retzius, P und T, oder P und Nut.

1. Entwickeln Sie eine Stimulation, mit der Sie die Abhängigkeit der postsynaptischen Antwort vom präsynaptischen Membranpotential und den präsynaptischen Aktionspotentialen bestimmen können. Dafür muss die Stimulation aus präsynaptischer De- und Hyperpolarisation verschiedener Stärke bestehen. (Je nach dem von Ihnen vorgesehenen Zellpaar bieten sich verschiedene Stimuli an - bitte besprechen Sie Ihre Planung mit mir um sich Enttäuschungen zu ersparen.)

2. Übertragen Sie das entsprechende Stimulationsprogramm auch auf die zweite Zelle (entweder als separates Stimulusprotokoll oder im selben Protokoll), um zu testen, ob die beiden Zellen sich reziprok beeinflussen.

3. Leiten Sie von den beiden Zellen mit dem gleichen Protokoll mehrfach ab.

4. Handelt es sich um eine reziproke Verbindung?
5. Handelt es sich um eine chemische oder eine elektrische Synapse?
6. Wenn Sie eine chemische Synapse ableiten, ändern Sie as Membranpotential der post-syaptischen Zelle, indem Sie am entsprechenden Verstärker einen “HOLDING CURRENT” einstellen. Führen Sie das gleiche Protokoll mit verschiedenen “HOLDING CURRENTS” aus, um das Umkehrpotential der Synapse zu finden.

9.4 Auswertung

Postsynaptischer Effekt Tragen Sie Mittelwert und Standardabweichung der postsynaptische Antwort gegen die präsynaptische Stimulationsstärke auf (falls sinnvoll sowohl für die beobachteten Membranpotentialwerte als auch für die resultierenden Spikeraten).

Kopplungsstärke Berechnen Sie für jeden trial und jede der verschiedenen Stimulusstärken die Kopplungsstärke als postsynaptischer Effekt / präsynaptischer Effekt. (Bei reziproken Synapsen ist das natürlich in beiden Richgungen notwendig). Tragen Sie Mittelwert und Standardabweichung der Synapsenstärke gegen die Reizstärke auf. Zeigen Sie ausserdem für eine exemplarische Stimulusstärke, ob sich die Synapsenstärke im Laufe des Experiments ändert, indem sie Kopplungsstärke gegen die Trialnummer auftragen. Stellen Sie synaptische Ermüdung oder Fazilitation fest?

Synaptische Latenz Bestimmen Sie die synaptische Latenz der Synapse. Hängt diese von der Stärke der präsynaptischen Reizung ab?

Chemisch oder elektrisch Begründen Sie, warum es sich bei der von Ihnen betrachteten Synapse um eine chemische bzw eine elektrische Verbindung handelt.

Literatur

liegt beim Praktikum bereit:

Verstärker-Handbuch: “Operating Instruction and System Description for the BA-1S Intracellular Bridge Mode Amplifier”, NPI electronic, version 4.1, 2004.

Oszilloskop-Handbuch: “Benutzerhandbuch Digitalspeicher Oszilloskop der Serie TDS1000 und TDS2000”, Tectronix

Axon-Guide: The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques, Axon Instruments, 1993

Neurobiology of the Leech: Muller, Nicholls & Stent (Eds.): Neurobiology of the Leech. Cold Spring Harbor Laboratory 1981

Englisches Praktikumsskript: Kristan & French: Boot Camp 2004 Division of Biological Sciences. Laboratory Manual. 2004